

**HIGHLY BRANCHED STARCH AND METHOD FOR PRODUCING THE SAME**

**Patent number:** JP2001294601  
**Publication date:** 2001-10-23  
**Inventor:** KAWABATA YASUYUKI; TOEDA KAZUYOSHI;  
TAKAHASHI TORU; SHIBAMOTO NORIO  
**Applicant:** AKITA PREFECTURE  
**Classification:**  
**- international:** C08B30/00; A23L1/10; A23L1/0522; C12N9/10;  
C12P19/18  
**- european:**  
**Application number:** JP20000108867 20000411  
**Priority number(s):** JP20000108867 20000411

**Abstract of JP2001294601**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To produce a highly branched starch increased in solubility, suppressed in aging and reduced in viscosity without decreasing the molecular weight to provide a method for producing the same, a method for suppressing the aging of a gelated starch from this starch and a method for producing foods and beverages including the starch. **SOLUTION:** This invention relates to (1) a highly branched starch that has the peak of chain branch distribution at 4-7 as the glucose unit chain length distribution according to the anionic ion-exchange chromatography, has high solubility in water where the solution has a low viscosity, and has a peak of the molecular weight distribution at  $2.0 \times 10^6$ ; (2) a method for producing the objective highly branched starch characteristically by allowing a branching enzyme to act on a gelated starch; (3) a method for suppressing the aging of the gelated starch by adding 0.1-100 wt.%, based on the solid component of the gelated starch, of the highly branched starch produced by the method described in (2); (4) a method for producing foods and beverages including the starch that is suppressed in aging by adding 0.1-100 wt.%, based on the starch, of the highly branched starch thereto.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

**BEST AVAILABLE COPY**

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号  
特開2001-294601  
(P2001-294601A)

(43)公開日 平成13年10月23日(2001.10.23)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	フィート(参考)
C 0 8 B 30/00		C 0 8 B 30/00	4 B 0 2 3
A 2 3 L 1/10		A 2 3 L 1/10	Z 4 B 0 2 5
	1/0522	C 1 2 N 9/10	4 B 0 5 0
C 1 2 N 9/10		C 1 2 P 19/18	4 B 0 6 4
C 1 2 P 19/18		A 2 3 L 1/195	4 C 0 9 0
審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 11 頁)			

(21)出願番号 特願2000-108867(P2000-108867)

(22)出願日 平成12年4月11日(2000.4.11)

(71)出願人 591108178

秋田県

秋田県秋田市山王4丁目1番1号

(72)発明者 川端 康之

大阪府東大阪市菱屋西4-2-26 大阪樟

蔭女子大学学芸学部食物学科内

(72)発明者 戸枝 一喜

秋田県秋田市新屋町字砂奴寄4-26 秋田

県総合食品研究所内

(74)代理人 100074077

弁理士 久保田 藤郎

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 高度分岐澱粉と該高度分岐澱粉の製造方法

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 澱粉を低分子化させずに、その溶解性の向上、老化抑制、粘度低下等を図ることのできる、高度分岐澱粉と、その製造方法、並びに該澱粉を用いた糊化澱粉の老化抑制方法と、該澱粉含有飲食物の製造方法の提供。

【解決手段】 ①分岐分布が陰イオン交換クロマトグラフィによるグルコース単位鎖長分布として4～7にピークを占めており、水溶性が高く、その水溶液が低粘度であり、かつゲル濾過分析において $2.0 \times 10^6$ に分子量の分布ピークをもつ高度分岐澱粉、②枝作り酵素を糊化澱粉に作用させることを特徴とする高度分岐澱粉の製造方法、③前記②に記載の製造方法により製造される高度分岐澱粉を糊化澱粉の固形分に対し0.1～100重量%添加することを特徴とする糊化澱粉の老化抑制方法、④高度分岐澱粉を、澱粉に対し0.1～100重量%添加したものをを用いる老化の抑制された澱粉を含有する飲食物の製造方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 分岐分布が陰イオン交換クロマトグラフィーによるグルコース単位鎖長分布として4〜7にピークを占めており、水溶性が高く、その水溶液が低粘度であり、かつゲル濾過分析において $2.0 \times 10^6$ に分子量の分布ピークをもつ高度分岐澱粉。

【請求項2】 枝作り酵素を糊化澱粉に作用させることを特徴とする、分子構造が原料の澱粉に比して密な分岐を有する高度分岐澱粉の製造方法。

【請求項3】 枝作り酵素が、ニューロスボラ・クラッサ (*Neurospora crassa*) に属するカビの突然変異株 N2-44株由来のものである請求項2記載の高度分岐澱粉の製造方法。

【請求項4】 枝作り酵素を、糊化澱粉1gあたり1〜1000単位添加することを特徴とする、請求項2又は3に記載の高度分岐澱粉の製造方法。

【請求項5】 請求項2〜4のいずれかに記載の製造方法により製造される高度分岐澱粉を、糊化澱粉の固形分に対し0.1〜100重量%添加することを特徴とする、糊化澱粉の老化抑制方法。

【請求項6】 澱粉を含有する飲食物の製造にあたり、澱粉として、請求項2〜4のいずれかに記載の製造方法により製造される高度分岐澱粉を、澱粉に対し0.1〜100重量%添加して得られたものを用いることを特徴とする、老化の抑制された澱粉を含有する飲食物の製造方法。

【請求項7】 請求項1記載の高度分岐澱粉を含有する飲食物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、原料の澱粉と比較して分岐構造が密な高度分岐澱粉と、該高度分岐澱粉を製造する方法と、該高度分岐澱粉を用いた糊化澱粉の老化抑制方法と、該高度分岐澱粉を用いた、老化の抑制された澱粉を含有する飲食物の製造方法とに関する。

【0002】

【従来の技術】 澱粉は、マルトース、水飴類等を製造するための原料、飲食用組成物、食品添加用組成物、或いは生物崩壊性プラスチック用材料などとして用いられている高分子物質である。

【0003】 しかし、一般的に澱粉は、溶解性が低い、老化しやすい、溶液の粘度が高い、などという問題がある。具体的には、澱粉は水に対する溶解性が低いため、澱粉を溶解するためには加熱処理を行ったり、有機溶媒、酸、アルカリ等による処理を行うことが必要である。また、溶解した澱粉もしくは糊化した澱粉は、迅速に老化し、不溶性の沈殿を生ずる。澱粉の老化は、澱粉溶液の粘弾性、澱粉の接着性等の物性を変化させる。

【0004】 また、澱粉(質)を含有する食品においては、保水性、保形性、冷凍耐性又は消化性の低下等の問

題が生じている。さらに、糊化した澱粉は、高い粘度を有し、取り扱いが困難となる。このように、既存の澱粉が有する上記性質上の問題点(溶解性の低さ、老化性、高粘度)は、食品及びその他の産業において、澱粉の利用を制限するものであった。

【0005】 そこで、これらの澱粉を低分子化することにより、溶解性及び耐老化性を向上させる研究が行われ、ある程度は老化を防止することができるようになった。しかし、過剰な分子量低下を抑えることは困難であり、高分子である本来の澱粉の持つ固有の性質を失うという問題が生じた。さらに、これらの方法では、澱粉の還元力が増加するため、タンパク質及びアミノ酸などと混合して加熱したとき、これらの物質との反応により澱粉が着色するため、その用途は制限されてきた。

【0006】 このため、これらの澱粉を低分子化することなく、溶解性を向上させたり、老化抑制、粘度低下等を図るための研究が行われている。例えば、澱粉の $\alpha$ 1, 4結合を切断し、 $\alpha$ 1, 6結合を転移反応により合成する酵素(枝作り酵素; EC 2. 4. 1. 18)を澱粉に反応させて、水溶性澱粉が得られている(特開昭60-75295号公報)。しかし、この方法で得られた水溶性澱粉は、詳細な構造が不明であるため、使用が制限されていた。

【0007】 また、バチルス (*Bacillus*) 属の細菌の生産する枝作り酵素を用いて、内分岐環状構造と外分岐構造部分とを有する、いわゆる大環状グルカンが得られている(特開平8-134104号公報、応用糖質科学, 43 (2), p 257~264, 1996)。しかし、このものは、環状構造の形成と共に分子量の大幅な低下が起こり、上記問題の解決に至っていない。

【0008】 一方、枝作り酵素は、様々な起源のものが報告されているが、得られる酵素量が少なく、酵素も不安定なため、実用化に至っているものはない。ニューロスボラ・クラッサ (*Neurospora crassa*) からの枝作り酵素の精製につき報告されている(澱粉科学, 30 (2), p 212-222, 1983)が、枝作り酵素を作用させて得られる生成物の性質、構造等の特性について十分な検討がなされていないため、実用化には至っていなかった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、上記従来の手段における問題点を解消し、澱粉を低分子化させずに、低分子化することなく澱粉本来の性質を著しく改良し、その溶解性の向上、老化抑制、粘度低下等を図ることのできる、原料の澱粉と比較して分岐構造が密な高度分岐澱粉と、該高度分岐澱粉を製造する方法とを提供することを目的とするものである。

【0010】 さらに、本発明は、該高度分岐澱粉を用いた糊化澱粉の老化抑制方法と、該高度分岐澱粉を用いた、老化の抑制された澱粉を含有する飲食物の製造方法

とを提供することを目的とするものである。換言すれば、本発明は、澱粉溶液の粘弾性、澱粉の接着性などの物性を変化させず、しかも澱粉（質）を含有する食品において、保水性、保形性、冷凍耐性又は消化性を低下させることなく、澱粉の老化の抑制された糊化澱粉の老化抑制方法と、該高度分岐澱粉を用いた、老化の抑制された澱粉を含有する飲食物の製造方法とを提供することを目的とするものである。

#### 【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、澱粉を低分子化することなく、物性を変化させる研究を実施した。鋭意研究を重ねた結果、ニューロスボラ・クラッサ（*Neurospora crassa*）に属するカビの生産する枝作り酵素を澱粉に十分作用させ、その澱粉を回収したところ、原料澱粉に比べ、より分岐構造が密な新たな澱粉、高度分岐澱粉が得られることを見出し、この知見に基づいて本発明を完成した。

【0012】即ち、請求項1に係る本発明は、分岐分布が陰イオン交換クロマトグラフィーによるグルコース単位鎖長分布として4～7にピークを占めており、水溶性が高く、その水溶液が低粘度であり、かつゲル濾過分析において $2.0 \times 10^6$ に分子量の分布ピークをもつ高度分岐澱粉を提供するものである。

【0013】請求項2に係る本発明は、枝作り酵素を糊化澱粉に作用させることを特徴とする、分子構造が原料の澱粉に比して密な分岐を有する高度分岐澱粉の製造方法を提供するものである。

【0014】請求項3に係る本発明は、枝作り酵素が、ニューロスボラ・クラッサ（*Neurospora crassa*）に属するカビの突然変異株 N2-44株由来のものである請求項2記載の高度分岐澱粉の製造方法を提供するものである。

【0015】請求項4に係る本発明は、枝作り酵素を、糊化澱粉1gあたり1～1000単位添加することと特徴とする、請求項2又は3に記載の高度分岐澱粉の製造方法を提供するものである。

【0016】請求項5に係る本発明は、請求項2～4のいずれかに記載の製造方法により製造される高度分岐澱粉を、糊化澱粉の固形分に対し0.1～100重量%添加することと特徴とする、糊化澱粉の老化抑制方法を提供するものである。

【0017】請求項6に係る本発明は、澱粉を含有する飲食物の製造にあたり、澱粉として、請求項2～4のいずれかに記載の製造方法により製造される高度分岐澱粉を、澱粉に対し0.1～100重量%添加して得られたものを用いることを特徴とする、老化の抑制された澱粉を含有する飲食物の製造方法を提供するものである。

【0018】請求項7に係る本発明は、請求項1記載の高度分岐澱粉を含有する飲食物を提供するものである。

#### 【0019】

【発明の実施の形態】本発明を詳細に説明する。請求項1に係る本発明は、分岐分布が陰イオン交換クロマトグラフィーによるグルコース単位鎖長分布として4～7にピークを占めており、水溶性が高く、その水溶液が低粘度であり、かつゲル濾過分析において $2.0 \times 10^6$ に分子量の分布ピークをもつ高度分岐澱粉である。

【0020】請求項1に係る本発明の新規高度分岐澱粉は、分岐分布が陰イオン交換クロマトグラフィーによるグルコース単位鎖長分布として4～7にピークを占めているものである。通常の澱粉の分岐鎖長（グルコース鎖長）は、同条件で測定した場合に、一般に9～10にピークを有していることから、請求項1に係る本発明の新規高度分岐澱粉は、非常に短い分岐鎖長を有することが分かる。請求項1に係る本発明の新規高度分岐澱粉は、通常の澱粉と比較して分岐が増加し、直鎖部分が短いものとなっているにもかかわらず、分子量は低下していない。請求項1に係る本発明の新規高度分岐澱粉は、ゲル濾過分析において $2.0 \times 10^6$ に分子量の分布ピークをもつものである。また、分子量の範囲としては、 $1.6 \times 10^5 \sim 5.3 \times 10^6$ のものである。

【0021】このような請求項1に係る本発明の新規高度分岐澱粉は、通常の澱粉と比較して、水等に対する溶解性が高く、しかも溶液を放置しても白濁が観察されず、老化しにくいものである。一般に、澱粉は冷水に不溶であるが、請求項1に係る本発明の新規高度分岐澱粉は、少なくとも20%（w/w）までは冷水に対して溶解することを確認している。さらに、請求項1に係る本発明の新規高度分岐澱粉は、原料澱粉糊化液に比べて、その水溶液が低粘度のものであり、取扱い性に優れたものである。後記実施例1における図4によれば、見かけ上の粘度値を比べると、請求項1に係る本発明の新規高度分岐澱粉は、原料澱粉糊化液のおよそ1/10に低下していることが分かる。

【0022】次に、請求項2に係る本発明は、枝作り酵素を糊化澱粉に作用させることを特徴とする、分子構造が原料の澱粉に比して密な分岐を有する高度分岐澱粉の製造方法である。このようにして得られる高度分岐澱粉は、請求項1に係る本発明として前記した通りのものである。

【0023】請求項2に係る本発明において、高度分岐澱粉を製造するために用いる枝作り酵素とは、澱粉の $\alpha$ 1, 4-グリコシド結合を、 $\alpha$ 1, 6-グリコシド結合に転移して新たな枝状構造を生成する作用を有する酵素である（EC 2.4.1.18）。この枝作り酵素としては、植物、動物及び微生物起源のものが見出されているが、請求項2に係る本発明の場合、ニューロスボラ・クラッサ（*Neurospora crassa*）に属するカビによって生産される枝作り酵素が好ましい。このような枝作り酵素を用いると、生成物の外分岐構造部分のグルコース鎖長が4から7のものが転移され、本発明の目的とす

る生成物が得られる。

【0024】枝作り酵素としては、特に請求項3に記載したように、枝作り酵素高生産株であるニューロスボラ・クラッサ (*Neurospora crassa*) に属するカビの突然変異株 N2-44 株由来の枝作り酵素が最も好ましい。

ニューロスボラ・クラッサ (*Neurospora crassa*) N2-44 株は、野生株のニューロスボラ・クラッサ (*Neurospora crassa*) IF0 6068 等から常法により変異株を得て、菌体内の枝作り酵素活性を指標として選抜することにより得ることができる。

【0025】請求項2に係る本発明は、上記した如き枝作り酵素を糊化澱粉に作用させることを特徴とする。高度分岐澱粉を製造するための原料となる澱粉は、通常、食用に供せられるものであれば特に限定することなく用いることができ、例えばコーンスターチ、ワキシコーンスターチ、米澱粉、餅米澱粉、馬鈴薯澱粉、甘藷澱粉、くず澱粉などを工業的に有利に用いることができる。さらに、澱粉から得られたアミロース、アミロペクチン、デキストリン等を原料としてもよい。請求項2に係る本発明においては、このような原料澱粉を糊化して得られる糊化澱粉を用いる必要がある。糊化の方法自体は、公知の方法を採用することができ、例えば、澱粉の水懸濁液を加熱もしくはアルカリ処理する方法等が挙げられる。また、ジメチルスルフォキシドなどの有機溶媒に溶解する方法も採用することができる。

【0026】このような糊化澱粉へ枝作り酵素を作用させる方法は、次のような条件下で好ましく実施することができる。まず、糊化澱粉は、水溶液状にして酵素反応に供することができるが、その濃度は、通常、0.1～20重量%が好ましい。糊化澱粉の濃度が0.1重量%未満であると原料が少な過ぎ、一方、20重量%を超えると澱粉の水への溶解が困難となるため、いずれも好ましくない。

【0027】次に、枝作り酵素は、請求項4に記載したように、糊化澱粉1gあたり、1～1000単位、好ましくは10～200単位となるように使用される。ここでいう酵素単位とは、1分間に1 $\mu$ molの無機リン酸の遊離量を増加させる枝作り酵素量を1単位としたものである。枝作り酵素の使用量が1単位未満であると酵素添加の意味がなく、一方、1000単位を超えると効果が頭打ちとなる上、製造コストの増大、生成物の回収に時間がかかる、等の弊害が生ずるため、いずれも好ましくない。

【0028】酵素反応は、温度0～50℃、好ましくは15～40℃、pH4.0～9.5、好ましくは6.5～8.5において、通常1～48時間実施され、一般に攪拌しながら実施することが望ましい。酵素反応終了後は、必要により反応液を60℃以上に加熱するなどして、枝作り酵素を失活させてもよい。

【0029】このようにして得られた生成物を遠心分

離、濾過等により不溶成分を除去し、水溶性画分を濃縮することで、目的とする高度分岐澱粉が得られる。

【0030】得られた高度分岐澱粉は、そのまま利用することができるが、保存に有利で、かつ飲食物の製造に利用しやすいように、乾燥し、粉末として得ることが望ましい。乾燥は、通常、凍結乾燥、或いは噴霧乾燥やドラム乾燥などの方法が利用できる。乾燥物は、必要により粉碎することが望ましい。

【0031】このようにして得られた高度分岐澱粉は、請求項1に記載した通りのものであり、分岐分布が陰イオン交換クロマトグラフィーによるグルコース単位鎖長分布として4～7にピークを占めており、水溶性が高く、その水溶液が低粘度であり、かつゲル濾過分析において2.0 $\times 10^6$ に分子量の分布ピークをもつものである。前記したように、通常の澱粉の分岐鎖長(グルコース鎖長)は、同条件で測定した場合に、一般に9～10にピークを有していることから、このようにして得られた高度分岐澱粉は、非常に短い分岐鎖長を有することが分かる。

【0032】このようにして得られた高度分岐澱粉は、原料の澱粉と比較して水等に対する溶解性が高く、溶液を放置しても白濁が観察されず、老化しにくい。このことから、糊化澱粉を調製する際に、このようにして得られた高度分岐澱粉を澱粉に添加することにより、糊化澱粉の老化を抑制することができる。このような糊化澱粉の老化抑制方法を提供するのが、請求項5に係る本発明である。

【0033】即ち、請求項5に係る本発明は、請求項2～4のいずれかに記載の製造方法により製造される高度分岐澱粉を、糊化澱粉の固形分に対し0.1～100重量%添加することを特徴とする、糊化澱粉の老化抑制方法である。

【0034】請求項2～4のいずれかに記載の製造方法により製造される高度分岐澱粉の添加量は、糊化澱粉の固形分に対し0.1～100重量%、好ましくは1～10重量%である。高度分岐澱粉の添加量が0.1重量%未満であると、添加の効果が現れず、一方、高度分岐澱粉の添加量が100重量%を超えると、原料澱粉の物性変化が著しいため、いずれも好ましくない。なお、糊化の方法については常法によって行うことができる。このようにして得られた糊化澱粉は、老化を抑制されたものである。

【0035】このような高度分岐澱粉の有する老化抑制機能は、澱粉を原料とする各種飲食物へも応用可能であり、食品の澱粉に起因する老化を抑制し、保存性を高めることも可能である。このような老化の抑制された飲食物の製造方法を提供するのが、請求項6に係る本発明である。

【0036】即ち、請求項6に係る本発明は、澱粉を含有する飲食物の製造にあたり、澱粉として、請求項2～

4のいずれかに記載の製造方法により製造される高度分岐澱粉を、澱粉に対し0.1~100重量%添加して得られたものを用いることを特徴とする、老化の抑制された澱粉を含有する飲食物の製造方法である。

【0037】この場合における、高度分岐澱粉の添加量は、澱粉に対し0.1~100重量%、好ましくは1~10重量%である。高度分岐澱粉の添加量が0.1重量%未満であると、添加効果が現れず、一方、高度分岐澱粉の添加量が100重量%を超えると、原料澱粉の性質を著しく変化させてしまい好ましくない。このようにして、老化の抑制された澱粉を含有する飲食物が得られる。この飲食物は、澱粉の老化に基く保水性、保形性、冷凍耐性、消化性などの低下が抑制されたものである。なお、澱粉を含有する飲食物としては、もち、だんご、クッキー、パン、めん類などが挙げられる。

【0038】最後に、請求項7に係る本発明は、前記した如き請求項1記載の高度分岐澱粉を含有する飲食物である。この際の請求項1記載の高度分岐澱粉の含有量は、通常、0.01~100重量%、好ましくは0.1~10重量%である。高度分岐澱粉の含有量が0.01重量%未満であると、含有させる効果が現れない。一方、高度分岐澱粉の含有量が100重量%を超えると、元の飲食物のもつ風味等を損なうおそれがあるため、いずれも好ましくない。なお、飲食物としては、例えば澱粉含有スポーツドリンクや澱粉含有栄養補助食品など様々な飲食物が挙げられるが、これに限定されるものではない。

#### 【0039】

【実施例】以下、実施例によって本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

#### 【0040】実施例1

##### (1) 枝作り酵素の活性測定

枝作り酵素の活性測定は、Sato & Sato (Analytical Biochemistry, 108 (1), 16-24, 1980)の方法に改良を加えた、以下の方法により行った。0.1Mグルコース-1-リン酸と2mM AMPとを含む溶液50 $\mu$ Lに、緩衝液で適当に希釈された枝作り酵素40 $\mu$ Lを加え、ウサギ筋肉由来のホスホリラーゼa (1mg/mL) 10 $\mu$ Lを添加することにより酵素反応を開始し、30℃で60分間反応後、1N過塩素酸水溶液1.0mLを加えることにより反応を停止した。遊離した無機リン酸をリン-バナダーモリブデン酸法(澱粉・関連糖質実験法p32-33, 1986)により枝作り酵素活性を測定した。なお、枝作り酵素活性1単位は、1分間に1 $\mu$ molの無機リン酸の遊離量を増加させる酵素量とした。

【0041】(2) ニューロスボラ・クラッサ (*Neurospora crassa*) 菌体の調製  
野生株のニューロスボラ・クラッサ (*Neurospora cra*

*ssa*) IF0 6068は、財団法人発酵研究所(大阪)から入手した。*N. crassa* IF0 6068の新たに調製した分生子を、1-メチル-3-ニトロ-1-ニトロソグアニジン(NTG)処理により変異させた。得られた変異株をランダムに釣菌し、菌体内の枝作り酵素活性を指標として選抜し、枝作り酵素高生産株を選抜し、ニューロスボラ・クラッサ (*Neurospora crassa*) N2-44株とした。

【0042】菌体生産のための培養は、30Lジャーファーメンターで行った。30Lジャーファーメンターに15Lの培地を仕込み、通気量15L/min、攪拌速度150rpm、30℃にて50時間培養した。培地組成は、3%グルコース、2%脱脂大豆粉、0.1%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.05%MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>Oとした。種母は4%とし、同様の培地で45時間フラスコ培養したものをを用いた。菌体は、濾過によって回収し、菌体の水分をよく除いたものを-30℃で保存した。この結果、1.2kg(湿重量)の菌体が回収された。

#### 【0043】(3) 枝作り酵素の活性

上記(2)で得られたニューロスボラ・クラッサ (*Neurospora crassa*) N2-44株の菌体20gに、石英砂と緩衝液A(5mM 2-メルカプトエタノールと1mM EDTAとを含む20mM グリシルグリシン緩衝液、pH8.0)100mLとを加え、乳鉢で磨砕した。磨砕物を遠心分離(10,000 $\times$ g、30min)した後、上清をNaOH溶液でpH8.0としたものを粗酵素液とした。この粗酵素液172mLを脱イオン水で2時間透析し、予め緩衝液Aで平衡化したカラム(Super Q Toyopearl-650M)に負荷した。枝作り酵素は、カラムに吸着し、0-0.3M NaCl濃度勾配により溶出した。

【0044】枝作り酵素活性のある画分を集め、緩衝液B(5mM 2-メルカプトエタノールと1mM EDTAとを含む20mM グリシルグリシン緩衝液、pH7.5)で透析し、限外濾過(YM-10)で3mLに濃縮した。濃縮物を予め緩衝液Bで平衡化したアミロース樹脂(Amylose resin)カラム(20 $\times$ 200mm)(New England BioLabs社製)に負荷した。枝作り酵素活性は、他のタンパク質に比べて遅れて溶出した。この画分は、SDS-PAGEで単一バンドを示し、集めて精製酵素とした。

#### 【0045】(4) 高度分岐澱粉の調製

ワキシコーンスターチ(1.0g、Sigma社製、S-9679)を蒸留水80mLに懸濁し、沸騰浴中で30分間過熱することにより完全に糊化し、澱粉糊化液を調製した。これに上記(3)で精製酵素として得られた枝作り酵素200単位(20mL)を加え、攪拌しつつ30℃で24時間反応させた。加熱処理により酵素を失活させた後、不溶物を遠心分離により除去し、凍結乾燥により高度分岐澱粉(HBS)を得た。

#### 【0046】(5) 高度分岐澱粉の分析

上記(4)で得られた高度分岐澱粉につき、以下の試験を行い、高度分岐澱粉の性状を調べた。

【0047】①枝作り反応による澱粉の物性の変化  
酵素反応の進行に伴う澱粉の物性変化(経時変化)を分析した。結果を図1～3に示す。

【0048】図1は、酵素反応の進行に伴う澱粉溶液の透明度(吸光度660nm)の変化を示したものである。図1から、酵素反応開始と共に速やかに濁度(吸光度660nm)の減少が観測され、澱粉溶液の透明度が向上したことが分かる。これは、澱粉に枝作り酵素が作用することにより澱粉の分岐が増加したため、澱粉の溶解度が増加しているためと考えられる。

【0049】図2は、酵素反応開始後、0時間後、2時間後、6時間後及び24時間後のヨウ素-澱粉複合体の吸収スペクトルの変化を示したものである。図2から、枝作り酵素の反応の進行に従って、吸光度が低くなり、最大吸収波長 $\lambda_{max}$ が、0時間後、2時間後、6時間後及び24時間後において、それぞれ530nm、525nm、521nm、508nmと短波長側に移行していることが分かる。この結果は、酵素の作用により澱粉の分岐構造が増加して直鎖部分が短くなり、これに起因してヨウ素の澱粉への結合量が減少していることを示唆している。

【0050】一方、図3は、酵素反応進行に伴う澱粉溶液中の還元糖量(グルコース中に占める割合)の変化を示したグラフである。図3から、反応溶液中の還元糖量の増加は0.1%以下であることが分かり、枝作り酵素の酵素反応に伴う還元末端の遊離は、無視して良いレベルであることが明らかである。

【0051】②高度分岐澱粉溶液と原料澱粉糊化液の粘性挙動

高度分岐澱粉溶液と原料澱粉糊化液とについて、以下のようにして、ずり速度と見かけ粘度の関係を測定し、粘性挙動を調べた。即ち、3%(w/w)に調製した高度分岐澱粉溶液と、対照としてのワキシコーンスターチを3%(w/w)に加熱糊化した原料澱粉糊化液とについて、BL型回転粘度計(トキメック(株)社製、BL-HM型)にH型少量サンプルアダプターを装着したものを、HM-1ロータにより、ずり速度と見かけ粘度の関係を測定した。結果を図4に示す。図4によれば、高度分岐澱粉溶液は、原料澱粉糊化液に比べて明らかに低い粘度を示した。ずり速度 $39.6\text{ s}^{-1}$ (30rpm)での見かけの粘度値を見ると、高度分岐澱粉溶液が $4.8\text{ mPa}\cdot\text{s}$ であるのに対し、原料澱粉糊化液は $49.2\text{ mPa}\cdot\text{s}$ であり、およそ1/10に粘度が低下したことが分かった。

【0052】③高度分岐澱粉のゲル濾過分析  
酵素反応による分子量分布の変化を、TSK-gel GMPW-XL(7.8×300mm、東ソー(株)社製)を用いたゲル濾過分析により検討した。その分析の

条件は、以下の通りである。

【0053】溶出溶媒として0.1M NaOH(流速0.5mL/min)を用い、検出にはRI検出器(HITACHI L-3350 RI Monitor)を用いた。酵素反応開始後、0時間経過時(つまり、酵素反応開始時であって原料のまま)、2時間経過時、12時間経過時及び24時間経過時でそれぞれサンプリングを行い、100℃、5分間の加熱処理により枝作り酵素を失活させた後、各サンプルの反応液のうち50μLをゲル濾過に供した。各サンプルのゲル濾過分析結果を図5に示す。なお、図5において、●はプルランを標準としたときの検量線データである。

【0054】図5に見られるように、酵素反応開始時のサンプル(原料のワキシコーンスターチ)には2つのピークが観察された。標準物質と比較した結果、これらはアミロペクチンとアミロースと判断した。酵素反応の進行と共にピークが低分子側に移行し、最終的には1本のピークに収束した。図5によると、この分子量は、プルランを標準としたときに $2.0 \times 10^6$ と算出されたことから、澱粉自体が低分子化したのではなく、枝作り酵素による転移反応により澱粉分子の立体構造が変化し、分子構造がコンパクトになるため、見かけ上低分子化したものと推察された。

【0055】④高度分岐澱粉の分岐鎖長(グルコース鎖長(DP))の測定

上記(4)で得られた高度分岐澱粉10mgを1.0mLの蒸留水に溶解させ、1M酢酸緩衝液(pH4.0)0.1mLとイソアミラーゼ10μL(70units)を加え、40℃で24時間反応させた。反応後、100℃、5分間の加熱処理を行い、イソアミラーゼを失活後、パルスドアンペロメトリック検出器を備えた高性能陰イオン交換クロマトグラフィー(Dionex BioLC Model DX-500)で分岐鎖の鎖長の分析を行った。

【0056】分析カラムには、CarboPac PA-1(Dionex BioLC)を用い、溶出は流速:1.0mL/min、NaOH濃度:150mM、酢酸ナトリウム濃度:0分-50mM、2分-50mM、37分-350mM(Gradient curve No.3)、45分-850mM(Gradient curve No.7)、47分-850mMの条件で行った。なお、コントロールとして、枝作り酵素を反応させなかったサンプル(すなわち、原料澱粉)についても、同様に分岐鎖の鎖長の分析を行った。これらの結果を図6に示す。図6中、●は高度分岐澱粉、○は枝作り酵素を反応させなかったサンプル(すなわち、原料澱粉)のそれぞれ分岐鎖長の測定結果を示す。

【0057】図6から、原料澱粉では、DP9-10に分岐分布ピークが存在しているのに対して、枝作り酵素処理した本発明の高度分岐澱粉では、DP4-7に分岐分布ピークがシフトしていた。このことは、枝作り酵素によって澱粉分子にDP4-7の新たな分岐が付加され

たことを示している。以上より、本発明の高度分岐澱粉は、澱粉分子に枝作り酵素が作用し、原料澱粉に比べて分岐の密な高度分岐澱粉が生成していることが分かった。

#### 【0058】⑤高度分岐澱粉溶液の老化特性

3% (w/w) に調製した高度分岐澱粉 (HBS) 溶液を4℃に2日間放置し、濁度の変化を観察した。コントロールとして、同じ3% (w/w) 濃度に調製したワキシコーンスターチ糊化液 (モチトウモロコシ澱粉糊化液) と、予め糊化後凍結乾燥したワキシコーンスターチを加熱溶解したもの ( $\alpha$ 化ワキシコーンスターチ溶液) とを用いた。濁度を比較すべく、3つの溶液を並べて撮影した写真から起こした模式図を図7に示す。なお、図7のA、B、Cは、それぞれ3% (w/w) 高度分岐澱粉溶液、3% (w/w) ワキシコーンスターチ糊化液、糊化後凍結乾燥したワキシコーンスターチを加熱溶解したものをそれぞれ示す。

【0059】図7から明らかなとおり、本発明の高度分岐澱粉 (A) は冷蔵保存後も透明であったが、他のもの (B、C) では老化による白濁が観察された。このことから、本発明の高度分岐澱粉は老化しにくい澱粉であるということが出来る。

#### 【0060】実施例 (高度分岐澱粉 (HBS) の応用例)

##### (1) 澱粉糊化液の粘度低下効果

3% ワキシコーンスターチ糊化液を調製し、終濃度が、それぞれ0% (無添加)、0.06%、0.15% となるように高度分岐澱粉を添加した。これら糊化液を室温まで冷却後、25℃に調整された部屋に1時間放置し、BL型回転粘度計を用いてずり応力とずり速度との関係を測定することにより、各糊化液の流動特性を調べた。BL型回転粘度計は、ホキメック (株) 社製BL-HM型にH型少量サンプルアダプターを装着したものをを用い、HM-1ローターでずり速度とずり応力との関係を測定した。その結果得られた各試験区における流動特性を図8に示す。なお、図8では、高度分岐澱粉無添加区を○で、0.06% (終濃度) 高度分岐澱粉添加区を□で、0.15% (終濃度) 高度分岐澱粉添加区を△で、それぞれ示した。

【0061】図8の結果から明らかなように、各ずり速度に対するずり応力は、無添加区 (○) に比べ、0.06% 添加区 (□)、0.15% 添加区 (△) の順に低くなった。すなわち、高度分岐澱粉は、澱粉糊化液の粘度を低くする効果を有することが明らかとなった。この結果によれば、高度分岐澱粉を利用することにより、澱粉の固形分量を増やすことなく粘度を低下させることができることから、高度分岐澱粉は、澱粉含量を減らすことが不都合な用途であって、しかも低粘性を求められる分野、例えば、澱粉系接着剤などの分野への応用が可能であることが明らかである。

##### 【0062】(2) 澱粉糊化液の透明化効果

上記澱粉糊化液の吸光度60nmにおける濁度変化を、調製直後、4℃で1日経過後、2日経過後にそれぞれ測定した。即ち、高度分岐澱粉無添加区、0.06% (終濃度) 高度分岐澱粉添加区、0.15% (終濃度) 高度分岐澱粉添加区の各サンプルについて、吸光度60nmにおける濁度変化を、調製直後、4℃で1日経過後、2日経過後にそれぞれ測定した。結果を図9に示す。なお、図9中、白抜きしたものが高度分岐澱粉無添加区、斜線で示したものが0.06% (終濃度) 高度分岐澱粉添加区、黒塗りしたものが0.15% (終濃度) 高度分岐澱粉添加区のそれぞれ結果である。

【0063】図9によれば、高度分岐澱粉を添加した区においては、濁度が低下しており、澱粉糊化液の透明度が高度分岐澱粉の添加により改善されていることが分かる。このことから、高度分岐澱粉は、糊化した澱粉の溶解を助ける働きがあることが推察された。

##### 【0064】(3) 澱粉糊化液の老化抑制効果

上記澱粉糊化液で、4℃で2日間保存したものを、再びBL型回転粘度計で、糊化液の流動特性を測定することにより、高度分岐澱粉の老化抑制効果について検討した。結果を図10に示す。なお、図10中、○は高度分岐澱粉無添加区、□は0.06% (終濃度) 高度分岐澱粉添加区、△は0.15% (終濃度) 高度分岐澱粉添加区のそれぞれ結果を示す。

【0065】図10によれば、老化糊化液についても高度分岐澱粉を添加した区では、粘度が低くなっていることが分かる。

【0066】また、上記澱粉糊化液のサンプルにおいて、調製直後と4℃で2時間保存後の見かけ粘度変化について、ローター回転数6rpm (ずり速度7.92 s<sup>-1</sup>) でのデータを比較した。結果を図11に示す。図11中、A、B、Cは、それぞれ高度分岐澱粉無添加区、0.06% (終濃度) 高度分岐澱粉添加区、0.15% (終濃度) 高度分岐澱粉添加区の結果であり、白抜きした方が調製直後、塗りつぶした方が4℃で2日間保存後の結果を示している。

【0067】図11によれば、調製直後における見かけ粘度の差に比べ、4℃で2日間放置後の見かけ粘度の差が大きくなっていることから、高度分岐澱粉の添加により、糊化澱粉の老化が抑制されているものと考えられる。

#### 【0068】実施例3 (高度分岐澱粉の食品への応用例)

高度分岐澱粉の食品への用途開発を目的として、上新粉を原料としただんごに高度分岐澱粉を添加し、高度分岐澱粉がだんごの硬さに与える影響について検討した。市販の上新粉100gに対し、高度分岐澱粉1.0gを添加したものに、60℃の温水を80g加え、ボールの中で5分間よく練った。生地をまとめて15gを1個として手のひらで丸め、熱湯で15分間ゆでた。ゆであがつ



たら冷水中にとり、流水で30分冷却し、水気を切って製品とした。また、比較のために、高度分岐澱粉を添加せずに作っただんごも用意した。

【0069】硬さの測定に当り、高度分岐澱粉を添加することなくだんごを調製してから25℃の部屋に1時間放置したもの（試験区A）、高度分岐澱粉を添加してだんごを調製してから25℃の部屋に1時間放置したもの（試験区B）、高度分岐澱粉を添加することなくだんごを調製してから4℃で2日放置後、さらに25℃に1時間放置したもの（試験区C）及び高度分岐澱粉を添加してだんごを調製してから4℃で2日放置後、さらに25℃に1時間放置したもの（試験区D）をそれぞれサンプルとした。

【0070】各試験区につき、それぞれだんご5個を調製し、それらの平均の硬さを求めた。これらの結果を図12に示す。硬さの測定は、（有）タケモト電機社製、テンシプレスTTP-50BX11（ロードセル10kg）を用い、直系2mmのプランジャーを使用して25℃にて測定した。だんごは、平坦なステージ上にプランジャーが中心を突き刺すようにセットし、各サンプルに対する最大応力を硬さの指標とした。装置の詳細な条件は、次の通りである：Road cell; 10kg, Distance 1; 50mm, Clearance; 5.0mm, Thickness 1; 30mm, Bites speed; 2.0mm/sec

【0071】図12によると、調製直後のだんご（試験区A、B）では、僅かに高度分岐澱粉を添加したもの（試験区B）が柔らかかった。また、ドウを練る段階で高度分岐澱粉を添加したものでは、粘りが出て粉のまとまりがよかった。1日冷蔵後のだんご（試験区C、D）では、高度分岐澱粉を添加したもの（試験区D）が柔らかく、高度分岐澱粉に老化抑制効果があることが示された。また、冷蔵保管サンプルの測定プロファイルを解析すると、高度分岐澱粉を添加したものでは、特にだんごの表面付近の柔らかさを保っており、だんご表面の保水効果が期待されると推察された。

#### 【0072】

【発明の効果】請求項1に係る本発明によれば、澱粉を低分子化させずに、低分子化によることなく澱粉本来の性質を著しく改良し、その溶解性の向上、老化抑制、粘度低下等を図ることのできる、原料の澱粉と比較して分岐構造が密な新規高度分岐澱粉が提供される。また、請求項2に係る本発明の方法によれば、枝作り酵素を糊化澱粉に作用させることにより、分子構造が原料（糊化）澱粉に比して密な分岐を有する高度分岐澱粉を得ることができる。得られる高度分岐澱粉は、溶解性が高く、耐老化性に優れ、溶液の粘度が低い等の取扱いが容易になるが、低分子化していないので、従来のデキストリンなどのような褐変を生じることがない。

【0073】さらに、請求項5に係る本発明によれば、該高度分岐澱粉を用いることにより、糊化した澱粉の老

化を抑制し、また、請求項6に係る本発明によれば、老化の抑制された澱粉を含有する飲食物を製造することができる。換言すれば、請求項5に係る本発明によれば、澱粉溶液の粘弾性、澱粉の接着性などの物性を変化させず、しかも澱粉（質）を含有する食品において、保水性、保形性、冷凍耐性又は消化性を低下させることなく、澱粉の老化を抑制することができ、また、請求項6に係る本発明によれば、そのような老化の抑制された澱粉を含有する飲食物を製造することができる。

【0074】従って、本発明の新規高度分岐澱粉は、低粘度性・高溶解性を利用した澱粉高含有スポーツドリンクや栄養補助食品などとして有効に利用することができる。また、これを澱粉糊化液や澱粉質含有食品に添加することにより、澱粉の老化に起因する様々な品質劣化を抑制することができる。さらに、食品用途にとどまらず、接着剤や生分解性ポリマー用の原料などの工業用途や、オブラートに代表される各種フィルム、カプセルの原料などの医薬用途としても利用が期待される。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】 実施例1における酵素反応の進行に伴う澱粉溶液の透明度の変化を示すグラフである。

【図2】 実施例1において、酵素反応開始後、0時間後、2時間後、6時間後及び24時間後のヨウ素-澱粉複合体の吸収スペクトルを示すグラフである。

【図3】 実施例1における酵素反応進行に伴う澱粉溶液中の還元糖量（グルコース中に占める割合）の変化を示すグラフである。

【図4】 実施例1において、高度分岐澱粉溶液と原料澱粉糊化液とについて、ずり速度と見かけ粘度の関係を測定し、粘性挙動を調べた結果を示すグラフである。

【図5】 実施例1において、酵素反応開始後、0時間後、2時間後、6時間後及び24時間後の枝作り酵素の反応産物のゲル濾過分析結果を示したものである。

【図6】 実施例1において、原料澱粉と高度分岐澱粉のそれぞれ単位鎖長分布の変化を示したものである。

【図7】 実施例1において、糊化澱粉溶液の濁度を示す模式図である。

【図8】 実施例2において、高度分岐澱粉の添加がずり応力とずり速度との関係に与える影響（流動特性）を示すグラフである。

【図9】 実施例2において、糊化澱粉の吸光度660nmにおける濁度変化を示すグラフである。

【図10】 実施例2において、保存後の糊化澱粉液への高度分岐澱粉の添加が、ずり反応とずり速度との関係に与える影響（流動特性）を示すグラフである。

【図11】 実施例2における澱粉糊化液のサンプルにおいて、調製直後と4℃で2時間保存後の見かけ粘度変化を示すグラフである。

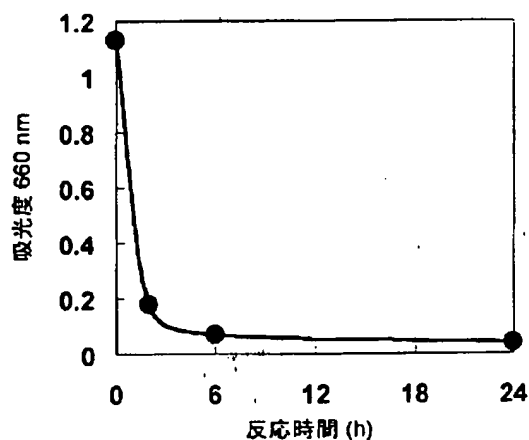
【図12】 実施例3におけるだんごの硬さの変化を示すグラフである。

# 【符号の説明】

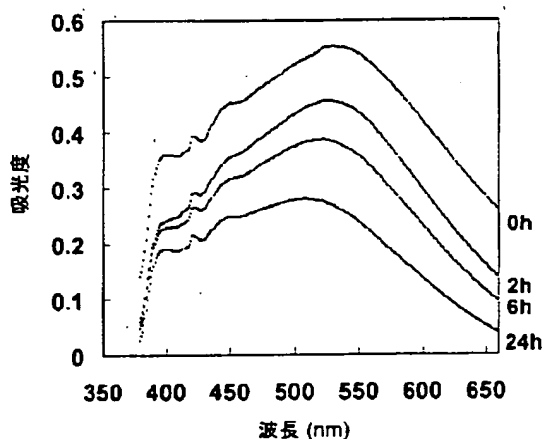
図4において、●は高度分岐澱粉溶液、○は原料澱粉糊化液のそれぞれ粘性挙動を示す。図5において、●はブルランを標準としたときの検量線データである。図6において、●は高度分岐澱粉、○は枝作り酵素を反応させなかったサンプル（すなわち、原料澱粉）のそれぞれ分岐鎖長の測定結果を示す。図7のA、B、Cは、それぞれ3%（W/W）高度分岐澱粉溶液、3%（W/W）ワキシーコーンスターチ糊化液、糊化後凍結乾燥したワキシーコーンスターチを加熱溶解したものをそれぞれ示す。図8では、高度分岐澱粉無添加区を○で、0.06%（終濃度）高度分岐澱粉添加区を□で、0.15%（終濃度）高度分岐澱粉添加区を△で、それぞれ示した。図9中、白抜きしたものが高度分岐澱粉無添加区、斜線で示したものが0.06%（終濃度）高度分岐澱粉添加区、黒塗りしたものが0.15%（終濃度）高度分岐澱粉添加区のそれぞれ結果である。図10中、○は高

度分岐澱粉無添加区、●0.06%（終濃度）高度分岐澱粉添加区、△は0.15%（終濃度）高度分岐澱粉添加区のそれぞれの結果を示す。図11中、A、B、Cは、それぞれ高度分岐澱粉無添加区、0.06%（終濃度）高度分岐澱粉添加区、0.15%（終濃度）高度分岐澱粉添加区の結果であり、白抜きした方が調製直後、塗りつぶした方が4℃で2日間保存後の結果を示している。図12中において、A、B、C、Dはそれぞれ、高度分岐澱粉を添加することなくだんごを調製してから25℃の部屋に1時間放置したもの（試験区A）、高度分岐澱粉を添加してだんごを調製してから25℃の部屋に1時間放置したもの（試験区B）、高度分岐澱粉を添加することなくだんごを調製してから4℃で2日放置後、さらに25℃に1時間放置したもの（試験区C）及び高度分岐澱粉を添加してだんごを調製してから4℃で2日放置後、さらに25℃に1時間放置したもの（試験区D）を示す。

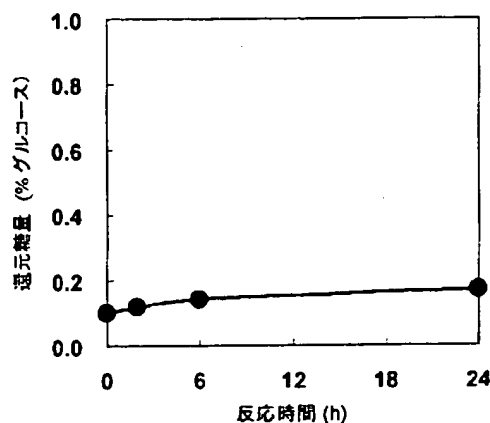
【図1】



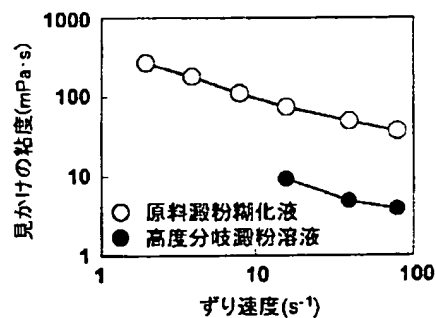
【図2】



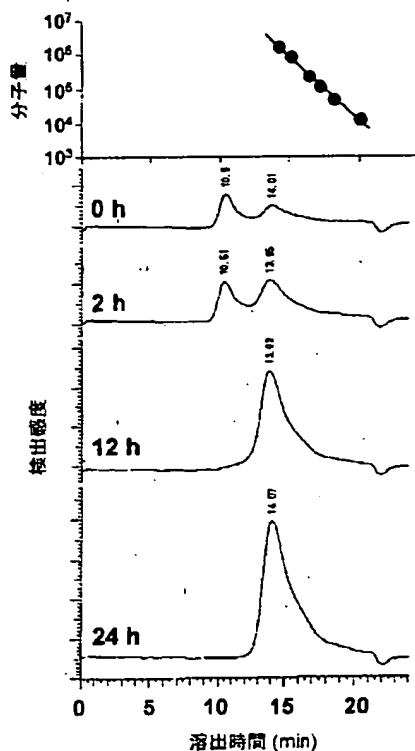
【図3】



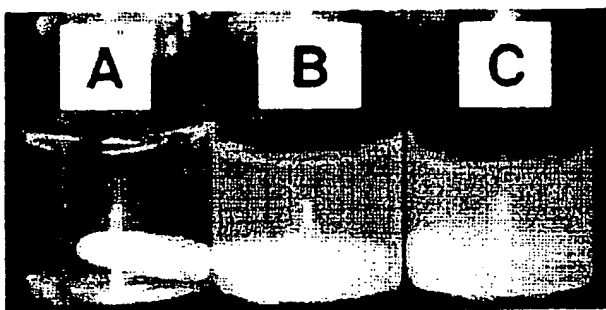
【図4】



【図5】

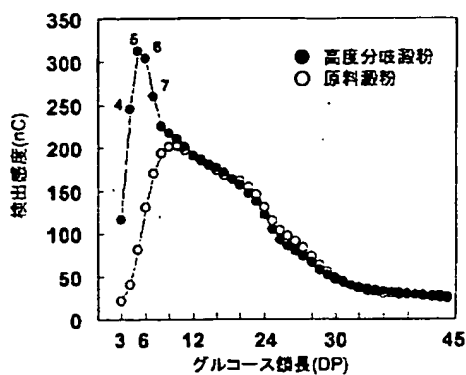


【図7】

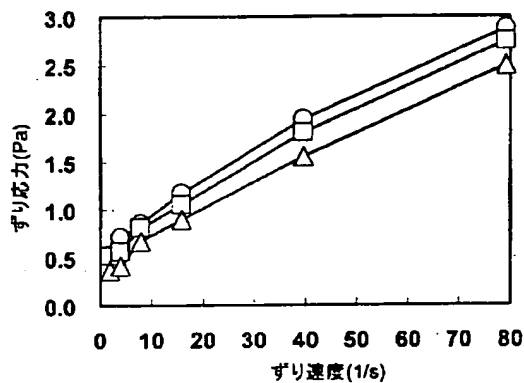


A, 3% 高度分岐澱粉  
B, 3% モチトウモロコシ澱粉糊化液  
C, 3%  $\alpha$  化モチトウモロコシ澱粉溶液

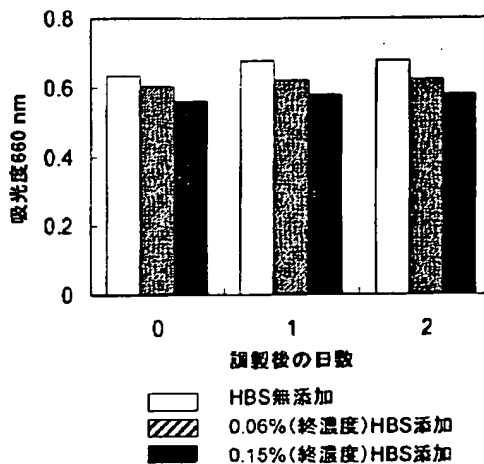
【図6】



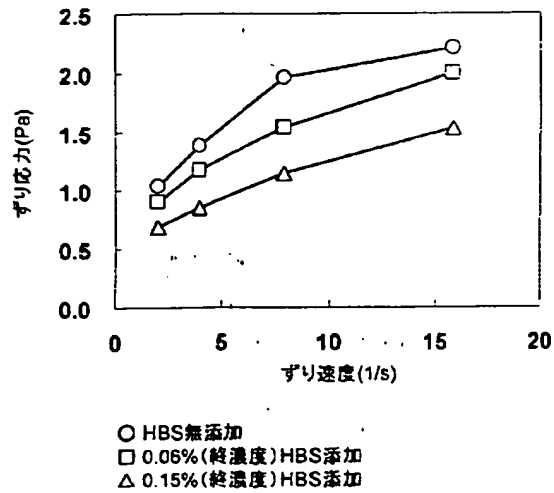
【図8】



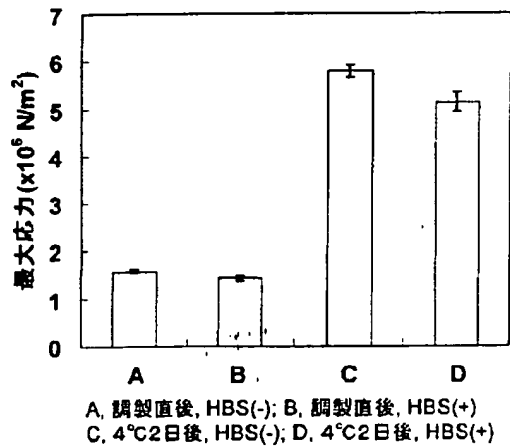
【図9】



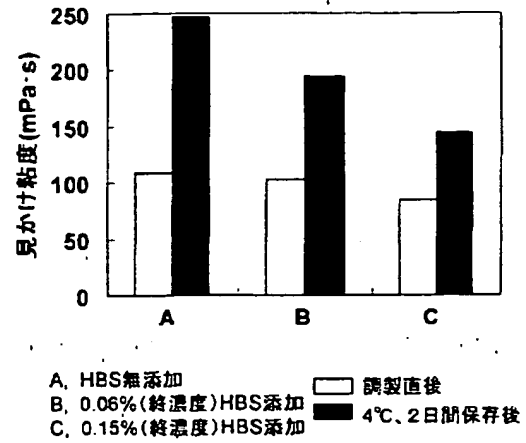
【図10】



【図12】



【図11】



フロントページの続き

(72)発明者 高橋 徹  
秋田県秋田市新屋町字砂奴寄 4-26 秋田  
県総合食品研究所内  
(72)発明者 柴本 憲夫  
秋田県秋田市新屋町字砂奴寄 4-26 秋田  
県総合食品研究所内

Fターム(参考) 4B023 LC05 LE26 LG06 LK08  
4B025 LB25 LD03 LE03 LG28 LG36  
LK04 LP19  
4B050 DD03 LL02  
4B064 AF12 BE01 BJ10 CA05 CA21  
CB07 DA10  
4C090 AA01 AA04 AA08 BA13 BB03  
BB12 BB32 BB36 BB52 BC01  
BD02 BD08 CA42 DA27

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**